

クロストリジウム属細菌を溶解する酵素に関する研究 (5) : クロストリジウム・HM2ファージの溶菌酵素の性質

緒方, 靖哉
九州大学農学部発酵学教室

田原, 康孝
静岡大学農学部農芸化学科

林田, 晋策
九州大学農学部発酵学教室

本江, 元吉
熊本工業大学微生物工学科

<https://doi.org/10.15017/22285>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 36 (2/3), pp.59-69, 1982-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

クロストリジウム属細菌を溶解する酵素に関する研究

V. クロストリジウム・HM2 フェージの溶菌酵素の性質

緒方 靖哉・田原 康孝*
林田 晋策・本江 元吉**

九州大学農学部発酵学教室
(1981年10月14日 受理)

Lytic Enzymes Active on *Clostridium* Species

V. Properties of Phage HM2-Induced Lytic Enzyme of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

SEIYA OGATA, YASUTAKA TAHARA,
SHINSAKU HAYASHIDA and MOTOYOSHI HONGO
Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-02, Fukuoka 812

緒 言

細菌細胞壁分解酵素は、卵白リゾチームをはじめ、微生物由来および高等植物や動物由来の酵素、さらにバクテリオフェージ由来などが知られている。これらの酵素は、細菌の細胞壁構造の解明やプロトプラストの調製に利用されており、また食品の腐敗防止剤や細菌による病気の治療剤としての利用性も期待されている。これらの酵素のうちで、フェージ由来の酵素は、フェージ感染によって誘導される特異的な酵素として注目され、新しい型の酵素の存在が考えられ、種々のフェージ-宿主系での研究が行なわれている(緒方, 1977; Tsugita, 1971)。

アセトン・ブタノールを生産する *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* は、形態や諸性状の異なる3種のフェージ(HM2, HM3, HM7)により感染を受ける(Hongo and Murata, 1965; Ogata *et al.*, 1969)。先に、HM7 フェージの溶菌酵素が N-acetylmuramyl L-alanine amidase (Hongo *et al.*, 1974; Ogata *et al.*, 1974) であり、HM3 フェージの溶菌酵素は N-acetylmuramidase (田原ら, 1975) であることを報告したが、1菌種に限定しても、フェ

ージの種類の違いによって、それらの溶菌酵素の性状はかなり相違する。*Escherichia coli* でも、T 偶数系のフェージが N-acetylmuramidase (Tsugita and Inoue, 1968)、λ フェージが endopeptidase (Taylor, 1971)、T7 フェージが N-acetylmuramyl L-alanine amidase (Inoue *et al.*, 1973) を生成することが知られている。本報では、残る1種の HM2 フェージが感染した該宿主菌の溶菌液から、HM2 フェージの溶菌酵素を分離精製し、その溶菌スペクトラムや諸性状を明らかにするとともに、該宿主菌の細胞壁やペプチドグリカンに対する作用点を解析した結果について報告する。

材料および方法

1. 使用菌株とフェージ

主に、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* の N1-4 株(ATCC 13564, 以下 N1-4 株と略)と HM2 フェージ(ATCC 13564-B₁) (Hongo and Murata, 1965; Ogata *et al.*, 1969) を使用した。その他、N1-504 株(ATCC 27022) (Hongo and Murata, 1965) や *Clostridium* 属細菌3種 (*C. acetobutylicum*, *C. kaneboi*, *C. sporogenes* IFO 12636) も使用した。

2. 培 地

* 静岡大学農学部農芸化学科
** 熊本工業大学微生物工学科

使用した菌株の培養には下記組成の TYA 培地を用いた。TYA 培地組成：グルコース 40 g, バクトトリプトン (Difco 社製) 6 g, 酵母エキス (大五栄養化学社製) 2 g, 酢酸アンモニウム 3 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg を純水 1 l に溶解し, pH 6.5 に調製した。

3. ファージ溶菌液の調製

N1-4 株を初発 O.D.₆₀₀ 0.1 から 0.3 になるように TYA 培地中で, 30°C で培養し, これに HM2 ファージを moi 5 で感染させ, さらに 4~6 時間培養した。得られた溶菌液の菌体破片物は遠心分離 (9,000 ×g, 10 min) で除去した。

4. ファージ溶菌酵素の精製

ファージ溶菌液に硫酸アンモニウムを 60% 飽和になるように加え, 2°C に 20 時間放置し, 生成した沈殿物を遠心分離 (10,000 ×g, 10 min) により集めた。沈殿物を少量の 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解し, 超遠心分離 (55,000 ×g) を行なつて混在するファージ粒子を除去した。上清を 50 倍容の同緩衝液 (pH 5.5) に対して, 2°C で 24 時間透析した。得られた酵素液を同緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースクロマトグラフィー (生化学工業社製, カラムサイズ 3.0 × 60 cm) に供し, NaCl 濃度を直線的に 0.5 M まで上昇させて溶菌酵素を溶出させた。溶菌酵素の溶出画分を 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 5.5) で透析した後, コロジオンバックで濃縮して, 実験に使用するまで 2°C に保存した。

5. 等電点分画

キャリアーアンホライン pH 範囲 3~10 を支持体として, 110 ml-LKB 電気泳動カラム (LKB 社製) を使用した。電気泳動は, 循環冷却を用いてカラム内の温度を 4°C に保ちながら, 400 V から 900 V の電圧勾配で 48 時間行なつた。泳動後, アンホラインを 2 ml ずつ分画し, 各画分の pH を pH メーター (タイプ M-5, 日立・堀場社製) で測定した。

6. ホルマリン処理菌体と熱処理菌体の調製

N1-4 株のホルマリン処理菌体と熱処理菌体を溶菌酵素の基質特異性を検するために次のように調製した。

N1-4 株の対数増殖期の菌体を集菌し, 5%ホルマリンを含んだ 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に懸濁し, 室温で 30 分間放置した。この処理菌体を水冷した 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で遠心洗浄してホルマリンを除き, 同じ緩衝液に懸濁した。ホルマリン処理は, 菌体の自己溶解を抑えるために行なつ

た。熱処理菌体は生菌体をそのまま或いは一度ホルマリン処理したものを 100°C で 2 分間熱処理して調製した。

7. 細胞壁の調製

N1-4 株の細胞壁は前報に準じて調製した (Ogata *et al.*, 1974)。N1-4 株の対数増殖期 (O.D.: 0.30) の菌体を遠心分離 (9,000 ×g, 5 min) によつて集菌し, 水冷した蒸留水に懸濁して, 音波発生装置 (モデル 200 M, 久保田社製) を使い出力 140 パワー (WATT) で, 15 分間音波をあてて菌体を破壊した。この菌体破壊液の粗細胞壁を分別遠心分離 (1,000 ×g, 30 min, 続いて 12,000 ×g, 30 min) によつて分画し, 直ちに, これを 1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の水溶液に懸濁し, 37°C で 15 時間, 振盪して反応させた。SDS 処理細胞壁を蒸留水で 5~7 回遠心洗浄後, これを 0.067 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し, 37°C で 4 時間トリプシン (Sigma 社製) 処理した。反応終了後は, 細胞壁を遠心分離 (12,000 ×g, 30 min) によつて集め, 再び蒸留水で 3~5 回遠心洗浄し, 最終的に少量の蒸留水存在下に凍結乾燥した。

他 3 種の *Clostridium* 属細菌と N1-504 株の細胞壁の調製も N1-4 株に準じて行なつた。

8. ペプチドグリカンとポリサッカライド画分の調製

細胞壁からのペプチドグリカンとポリサッカライド画分は Perkins (1965) のホルムアミド抽出法に準じて分画調製した。細胞壁をホルムアミドに懸濁し, 150°C, 15 分間加熱した。冷却後, 2 倍容の酸-エタノール (2 N 塩酸-エタノール 1:9 v/v) を加え, 遠心分離 (12,000 ×g, 30 min) して, 不溶性画分と可溶性画分とに分画した。不溶性画分からのペプチドグリカンは遠心残査を再び酸-エタノールで遠心洗浄し, さらにエタノール, エチルエーテルの順に遠沈洗浄後, エチルエーテルを減圧で除去して調製した。可溶性画分からのポリサッカライド画分は遠沈上清に 4 倍容のアセトンを加え, ポリサッカライドを沈殿させ, アセトン-エタノール (1:1 v/v) で 3~5 回遠沈洗浄を繰り返した後これを少量の蒸留水に溶解し, 凍結乾燥して調製した。この調製法により, 細胞壁 1,000 mg からペプチドグリカン 500 mg とポリサッカライド 125 mg とを得た。

9. 濁度の測定

菌の生育度や菌体, 細胞壁とペプチドグリカンの懸濁液の濁度変化は比色計 (モデル 7 A, 日本光電社

製、或いはタイプ 101, 日立製作所製) の 660 nm の吸光度 (O.D.) で測定した。

10. 酵素活性の測定

溶菌酵素活性は細胞壁の濁度の減少から測定した。2 mg の細胞壁を 0.45 ml の 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁し、これに 0.05 ml の酵素液を加えて反応系を調製した。反応は、30°C で行ない、10 分間隔に濁度の減少を測定した。溶菌酵素の酵素活性 (Units) は、1 分間あたりの O.D.₆₆₀ の減少が 0.001 の時のそれを 1 unit と定め、次式から算出した。

$$\text{units} = 4 \text{O.D.}_{660} \times 1,000 / \text{min.}$$
 比活性は、タンパク質 1 mg あたりの酵素活性で計算した。なお、タンパク質量は Lowry (1951) の方法に準じて定量した。

11. アミノ酸とアミノ糖の同定、定量

細胞壁、ペプチドグリカンおよびポリサッカライド画分のアミノ酸とアミノ糖はアミノ酸自動分析器 (モデル JLC-5, 日本電子社製) を用いて同定、定量した。各試料の 2 mg に 4 N 塩酸 100 μ l を加えて封管し、105°C、12 時間加水分解した。酸加水分解物を五酸化リンと NaOH の存在下で減圧乾固し、残渣に各試料が 1 mg/ml になるように 0.2 M のクエン酸緩衝液 (pH 2.2) を加え、これをアミノ酸自動分析器を用いて同定、定量した。

12. 分解生成物の化学分析

分解生成物の遊離還元基は Tsugita and Inoue (1968) のホウ素化水素ナトリウム (NaBH₄) 還元法に従って同定、定量した。10 mg の分解生成物に 0.6 ml の 0.1 M NaBH₄ 水溶液を加え、室温に 3 時間放置し、分解生成物の遊離還元基を糖アルコールに還元した。これに 0.3 ml の濃塩酸を加え、105°C、6 時間加水分解した。酸加水分解物を P₂O₅ と NaOH の存在下で減圧乾固した後、5 ml のメタノールを加え、還元時に残存したホウ酸をホウ酸メチルに変え減圧下で蒸発除去した。NaBH₄ によつて還元された分解生成物の構成アミノ糖とアミノ酸はアミノ酸自動分析器を用いて同定、定量した。

分解生成物中の N-末端アミノ酸は, Ghuyssen *et al.* (1966) の方法に従って同定した。200 μ l の 1% ホウ酸ナトリウムに溶解した約 0.5 mg の分解生成物に、0.1% のジニトロフルオロベンゼン (DNFB) のエタノール溶液 40 μ l を加え、60°C で 30 分間 DNP 化した。反応後、過剰の DNFB をエーテルで抽出して除去し、水槽に 120 μ l の濃塩酸を加えて封管し、105°C で 8 時間加熱して DNP 化した物を加水分解した。加水分解物中の DNP-アミノ酸をエーテルに抽

出し、これをアルカリデシケーターを用いて減圧乾固した。DNP-アミノ酸の同定にはスポットフィルム (東京化成社製) を用いた。

また、還元基は Somogyi-Nelson の方法 (Somogyi, 1952) に、アミノ基は Yemm and Cocking (1955) の方法に従って定量した。

13. アラニン光学異性体の同定、定量

分解生成物中のアラニン光学異性体の同定と定量は先報 (Ogata *et al.*, 1975) と Hasegawa and Matsubara (1975) の方法に従って、ガスクロマトグラフィーで同定、定量した。

アラニンの N-TFA-*l*-メンチルエステル化: 分解生成物 (アラニンを 0.5~1.0 mg 含む) に *l*-メントール 250 mg を加え、110°C で乾燥塩酸ガスを吹き込みつつ、1 時間メチルエステル化した。過剰の *l*-メントールを 110°C で乾燥塩酸ガスを吹き込みつつ昇華除去した後、無水トリフルオロ酢酸 (TFAA) 0.5 ml を加え、室温で 5 分間攪拌しつつ反応させた。N-TFA-*l*-メンチルエステル化反応後、過剰の TFAA を室温で乾燥窒素ガスを吹き込んで蒸発除去し、合成されたアラニンの N-TFA-*l*-メンチルエステルに 0.5 ml のアセトンを加え 4°C で保存した。

ガスクロマトグラフィー: ガスクロマトグラフィー (モデル 163, 日立製作所製) によるアラニンの N-TFA-メンチルエステルの分析条件は Adipate を 5% コートしたポリエチレングリコール (80~100 ムッシュ) を直径 3 mm, 長さ 4 m のステンレスカラムに充てんしたものを使用した。検出には、水素炎イオン化検出器を用い、カラム温度を 170°C の恒温にして、キャリアーガスには窒素を用いた。

14. リンの定量

Chen *et al.* (1956) の方法に従って定量した。

実験結果

1. HM2 フェージ溶菌酵素の分離精製

HM2 フェージ溶菌酵素の生成の至適条件を、フェージ感染時の宿主菌の菌令 (O.D.₆₆₀) と感染多重度 (moi) について検討した結果、溶菌酵素の生成量は、宿主菌の O.D.₆₆₀ が 0.30~0.35 の時、moi 3~5 でフェージを感染させた場合に最大であつた。この至適条件下での HM2 フェージ溶菌酵素の培地中への生成蓄積を Fig. 1 に示した。感染後直ちに宿主菌の増殖は停止し、5 時間目頃から徐々に溶菌した。フェージ溶菌酵素の生成集積は、感染後 1 時間目頃から検出され、その後、その量は急速に増加し、溶菌の始まる 5

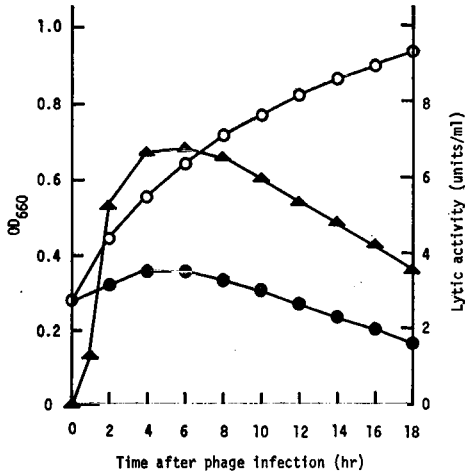


Fig. 1. Time course of production of phage HM 2-induced lytic enzyme. The host cells (OD_{660} : 0.30) in the logarithmic phase were infected with phage HM 2 at moi of 5, and the cultivation was continued at 30°C. The infected culture was withdrawn at the various ages, and was immediately centrifuged at $55,000 \times g$ for 60 min to remove whole cells, cell debris and phage particles. The supernatant was assayed for the lytic enzyme activity as described in Materials and Methods. ○: normal growth, ●: phage HM2 infected growth, ▲: phage HM 2-induced lytic enzyme.

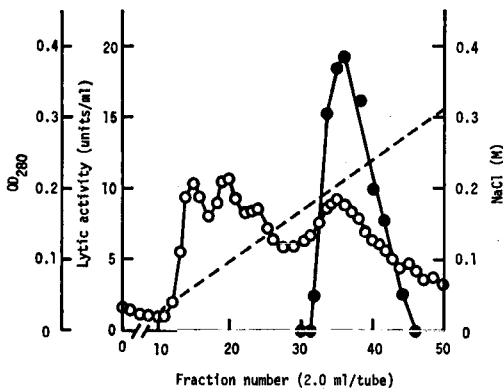


Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography of phage HM 2-induced lytic enzyme. The enzyme solution obtained by salting-out of the supernatant of the lysate was applied to a column (1.5×17 cm) equilibrated with 0.067 M phosphate buffer at pH 5.0, and eluted by a linear of NaCl concentration in the same buffer. ●: lytic enzyme activity, ○: OD_{280} , ---: NaCl.

時間目頃に最大値 (6.5 units) を示した。

HM 2 ファージの溶菌酵素をファージ溶菌液から、硫酸塩析, 次いで DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを用いて比活性約 100 倍まで分離精製した。溶出パターンを示す Fig. 2 のように, 本溶菌酵素は NaCl の 0.20~0.25 M で溶出された。この酵素活性画分には遊離ファージは全く検出されなかった。

2. HM2 ファージ溶菌酵素の基質特異性

Fig. 3 に示すように, HM 2 ファージの溶菌酵素はその宿主菌のホルマリン処理菌体や熱処理菌体を全く溶菌せず, 細胞壁とペプチドグリカン溶解する特異性を示した。また増殖している菌体 (生菌体) に作用させたが, 全く溶解できなかつた。

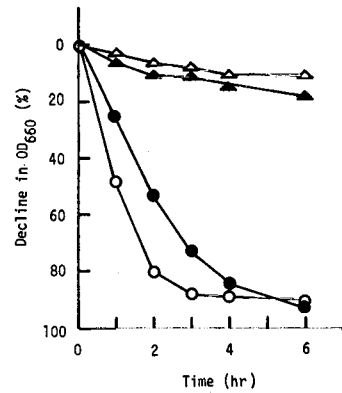


Fig. 3. Action of phage HM 2-induced lytic enzyme toward whole cells and cell wall of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Various substrates (initial OD_{660} : 0.60) and lytic enzyme (4.5 units/ml) were incubated in 0.067 M phosphate buffer (pH 5.0) at 30°C. ○: cell wall, ●: peptidoglycan, ▲: heated cells, △: formalin-treated cells.

これらの結果はこれまでに報告した *Clostridium* 属細菌の生菌体やホルマリン処理菌体を強く溶菌する HM 7 ファージ (Hongo *et al.*, 1974), HM 3 ファージ (田原ら, 1975) や不完全ファージ・クロストシン O (Ogata and Hongo, 1979; 一部未発表) の溶菌酵素とは, その基質特異性が全く異なることを示している。

宿主菌細胞壁以外の N1-504 株, *C. acetobutylicum*, *C. kaneboi*, *C. sporogenes* の細胞壁に対する HM 2 ファージ溶菌酵素の溶解作用を検した。Fig. 4 に示すように, 本酵素は, その宿主菌と N1-504 株の細胞壁の濁度を 90 以上減少させるのに対して, 同じ反応条件下で, *C. sporogenes*, *C. kaneboi* の細胞

壁の濁度をそれぞれ 67%, 54% 減少させた。他方, *C. acetobutylicum* の細胞壁を全く溶解せず, また供試したこれらの *Clostridium* 属細菌の生菌体やホルマリン処理菌体に対しても全く溶解作用を示さなかった。このように, HM2 フェージ溶菌酵素は高い基質特異性を呈した。

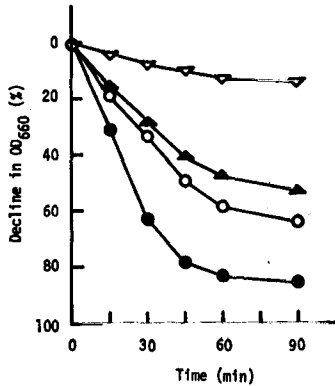


Fig. 4. Action of phage HM 2-induced lytic enzyme toward cell walls of various *Clostridium* species. Various cell walls (initial OD₆₆₀: 0.45) and lytic enzyme (4.5 units/ml) were incubated in 0.067 M phosphate buffer (pH 5.0) at 30°C. ●: *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 and N1-504, ○: *C. sporogenes*, ▲: *C. kaneboi*, △: *C. acetobutylicum*.

3. HM2 フェージ溶菌酵素の至適 pH

HM2 フェージ溶菌酵素の宿主菌細胞壁とペプチドグリカンに対する酵素作用に及ぼす pH の影響を, 溶解活性と溶解に伴って遊離してくる分解生成物から検した。Fig. 5 に示すように, 本酵素の細胞壁に対する溶解活性の至適 pH は 5.0 にあり, ペプチドグリカンに対する至適 pH は 4.0 にあつた。これは, 本酵素の細胞壁とペプチドグリカンに対する溶解活性の至適 pH が基質により異なつた値を持つことを示している。

次に, 各基質の分解に伴って遊離する分解生成物を定量したところ, 細胞壁からの分解生成物としては, 遊離還元基と遊離アミノ基が検出された。還元基の遊離は pH 4.0 で最大であり, アミノ基の遊離は pH 5.0 で最大であつた。他方, ペプチドグリカンを用いた場合の分解生成物としては, 遊離還元基のみが検出され, 遊離アミノ基は全く検出されなかつた。還元基の遊離は pH 4.0 であつた。このように, 本酵素は, 細胞壁を基質にするかペプチドグリカンを基質にするかによつて, また反応系の pH の違いによつて, 作用

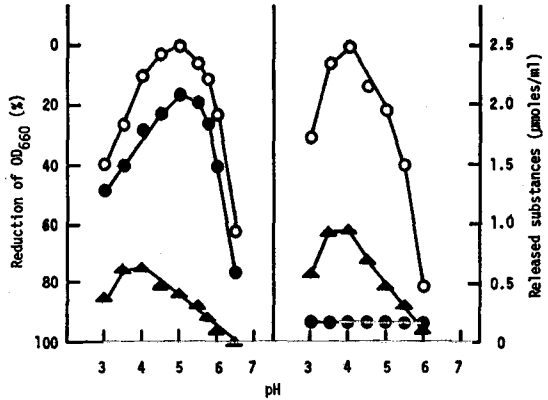


Fig. 5. Releases of reducing groups and amino groups of cell wall or peptidoglycan by action of phage HM 2-induced lytic enzyme at various pH. Two mg of the cell wall or the peptidoglycan were suspended in 0.5 ml of 0.05 M acetate buffer or 0.067 M phosphate buffer of various pH indicated in figure and then added 4.5 units of lytic enzyme. After incubations were carried out at 30°C for 2 hr, an aliquot of the mixture was assayed. Left: cell wall, right: peptidoglycan, ○: turbidity, ▲: reducing groups, ●: amino groups.

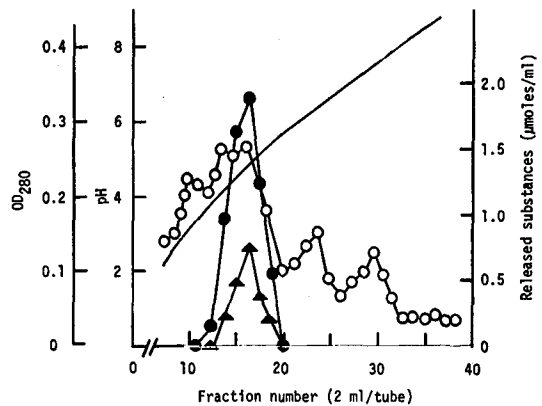


Fig. 6. Electrophoresis of phage HM 2-induced lytic enzyme on isoelectric focusing. The enzyme solution was applied on a 110 ml-LKB column, and electrophoresis was carried out with potential gradient of 400 to 900 V for 48 hr, maintaining column temperature at 4°C by circulating chill water. Lytic enzyme activities were assayed as described in Materials and Methods. ▲: reducing groups (lytic activity I), ●: amino groups (lytic activity II), ○: OD₂₈₀, —: pH.

様式が異なつていた。

これらの結果は, HM2 フェージの溶菌酵素には, 二種の溶菌酵素作用, すなわち至適 pH 4.0 で, ペプ

チドグリカンと細胞壁から還元基のみを遊離させて、これらを溶解する酵素作用と、至適 pH 5.0 で、ペプチドグリカンには作用せず細胞壁のみに作用してアミノ基を遊離させる酵素作用とが存することを示している。従つて、以後の実験では、前者を酵素作用 I、後者を酵素作用 II と略記し、酵素作用 I はペプチドグリカンから遊離還元基を、酵素作用 II は細胞壁から遊離アミノ基を定量することによつて、両酵素作用を分別測定した。なお、Fig. 6 に示すように、酵素作用 I と酵素作用 II は、アンホライン等電点法によつてはそれぞれを分離することはできなかった。

4. 2価金属イオンと EDTA の酵素活性に及ぼす影響

酵素活性に及ぼす各種の 2 価金属塩と EDTA の影響を検した。Table 1 に示すように、酵素作用 I、II とともに、供試した 2 価金属イオンと EDTA による促進効果は認められず、逆に 2 価金属イオンによつて阻害される傾向を示した。阻害は酵素作用 II より酵素作用 I の方が強く受け、酵素作用 I は $10^{-3}M$ Ca^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} でそれぞれ 15~25% 阻害され、 $10^{-4}M$ Cu^{2+} で完全に阻害された。酵素作用 II は $10^{-3}M$ の Cd^{2+} で 20%, $10^{-4}M$ Cu^{2+} で 86% 阻害された。

Table 1. Effect of bivalent cations and EDTA on lytic enzyme activity. Each assay mixture contained 8.5 units of lytic enzyme activity.

Salt addition	Molarity	Lytic activity (%)	
		Enz. 1	Enz. 2
none	—	100	100
$MgSO_4$	10^{-3}	104	100
$MnSO_4$	10^{-3}	97	105
$CaCl_2$	10^{-3}	76	100
$CoCl_2$	10^{-3}	95	95
$CdCl_2$	10^{-3}	75	80
$CuSO_4$	10^{-4}	0	14
$NiSO_4$	10^{-3}	85	95
EDTA	10^{-3}	100	100

5. HM 2 フェージ溶菌酵素の熱安定性

溶菌酵素の熱安定性について検したところ、Fig. 7 に示すように、酵素作用 I は $50^\circ C$ 、5 分間の熱処理で 90% 失活し、 $55^\circ C$ 、5 分間の処理で完全に失活した。酵素作用 II は $50^\circ C$ 、5 分間の熱処理で完全に失活した。両酵素作用間の熱安定性にはほとんど差違は認められなかったが、酵素作用 I の方が僅かに熱安定性があると考えられた。既に報告している HM 7 フェージ (Hongo *et al.*, 1974) と HM 3 フェージ (田原ら, 1975) の溶菌酵素は、 $50^\circ C$ 、5 分間の熱処理で、それぞれ 75% と 100% 失活している。本酵素も、これら

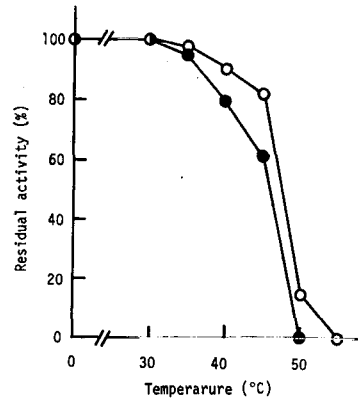


Fig. 7. Stability of phage HM 2-induced lytic enzyme at various temperatures. The enzyme solutions were heated for 5 min at various temperatures indicated in figure, and immediately cooled at $2^\circ C$. Residual lytic enzyme activities were assayed as described in Materials and Methods. Initial lytic enzyme activity: 12 units. ○: enzyme activity I, ●: enzyme activity II.

の酵素と同様に、比較的熱に不安定な酵素であると考えられた。

6. HM 2 フェージ溶菌酵素の作用点の解析

酵素作用 I と酵素作用 II の細菌壁とペプチドグリカ

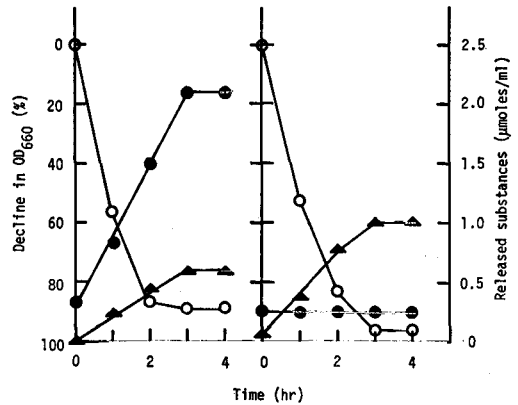


Fig. 8. Releases of reducing groups and amino groups of cell wall or peptidoglycan by action of phage HM 2-induced lytic enzyme. Two mg of the cell wall or peptidoglycan was suspended in 0.5 ml of 0.05M acetate buffer (pH 5.0) containing 4.5 units of lytic enzyme, but, in the case of the peptidoglycan, pH 4.0 of buffer was used. Incubations were carried out at $30^\circ C$. An aliquot of the mixtures was withdrawn at various times indicated in figure and assayed. Left: cell wall (at pH 5.0), right: peptidoglycan (at pH 4.0), ○: turbidity, ▲: reducing groups, ●: amino groups.

ンに対する分解の時間経過を検したところ、Fig. 8 に示すように、酵素作用 I は細胞壁とペプチドグリカンから還元基を遊離し、酵素作用 II は細胞壁からのみアミノ基を遊離させ、ペプチドグリカンからはアミノ基を遊離させなかつた。これらの結果は、酵素作用 I がペプチドグリカンのグリカン部を切断する N-acetylglucosaminidase 或いは N-acetylmuramidase であることを示唆し、酵素作用 II は細胞壁に存在するタイコ酸様物質からアミノ酸 (D-アラニン) を遊離する酵素であることを示唆すると考えられた。従つて、次に、酵素作用 I と II の作用点を明らかにするため、分解生成物の化学分析を行なつた。

a. 酵素作用 I の分解生成物の化学分析

45 units の溶菌酵素と 20 mg のペプチドグリカンを 5 ml の 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解した反応系でペプチドグリカンを完全に分解させた。反応停止後、分解生成物を 20 倍容の蒸留水に対して、2°C で 24 時間透析し、透析外液の透析性低分子分解生成物をロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。この分解生成物の還元末端基をホウ素化水素ナトリウム (NaBH₄) で還元し、次に、酸加水分解して、得られた酸加水分解物をアミノ酸自動分析器を用いて同定、定量した。Table 2 に示すように、酵素作用 I によつて得られた分解生成物を NaBH₄ 処理することにより、ムラミン酸量は対照に比べて 32% 減少した。しかしグルコサミンとアミノ酸の量には変化は認められなかつた。従つて、これらの結果より、HM2 ファージ溶菌酵素の酵素作用 I は、卵白等のリゾチームや HM3 ファージ溶菌酵素と同じ作用点を有する N-acetylmuramidase 作用であることが示された。

Table 2. Analysis of peptidoglycan digested with phage HM 2-induced lytic enzyme (Enz. activity I).

Compound	No reduction	Reduction with NaBH ₄
	(μmoles/mg of peptidoglycan)	
Muramic acid	0.314	0.203
Glucosamine	0.562	0.575
Glutamic acid	0.550	0.554
Alanine	1.100	1.120
Diaminopimelic acid	0.520	0.520
Ammonia	0.654	0.675

b. 酵素作用 II の分解生成物の化学分析

45 units の溶菌酵素と 20 mg の細胞壁を 5 ml の 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した反応系で、細胞壁が完全に分解するまで反応させ、分解生成物を

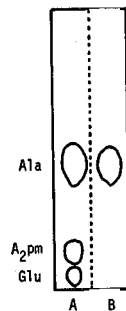


Fig. 9. TLC of NH₂-terminal amino acid of released substance. A: authentic DNP-amino acid, B: released substance.

Table 3. Analysis of configuration of alanine in digested cell wall on gas chromatography.

Treatment	Molar ratio to L-alanine	
	L-Ala	D-Ala
DNP-treatment	1.00	1.30
None	1.00	1.90

上記 a と同様に調製し、凍結乾燥した。この分解生成物の N-末端アミノ酸を DNP 化し、これを酸加水分解した後、スポットフィルム上で同定したところ、Fig. 9 に示すように、アラニンのみが検出された。次に、N-末端アラニンの光学活性を検した。Table 3 に示すように、N-末端アラニンが除去されていない対照の分解生成物中には D-アラニンと L-アラニンがモル比 1.90 : 1.00 で存在するのに対し、DNP 化によつて N-末端アラニンが除去された分解生成物中の D-アラニンと L-アラニンのモル比は 1.30 : 1.00 であつた。すなわち、N-末端アラニンを除去した分解生成物中の D-アラニンが、対照の D-アラニンに比べて、32% 減少した。この結果は、分解生成物の N-末端アラニンが D-アラニンであることを示している。

一方、Fig. 10 と Table 4 に示すように、本宿主菌の細胞壁中には D-アラニンと L-アラニンが 2 : 1 のモル比で存在しているが、この 2 個の D-アラニンのうち、1 個はペプチドグリカンのペプチド部に存在する D-アラニンであり (Fig. 10)、他は、タイコ酸様物質に存在する D-アラニンであることがポリサッカライド画分の分析から明らかになつた (Fig. 10)。また、Table 5 に示すようにポリサッカライド画分は比較的少量のリンを含むことも、タイコ酸様物質の存在を示唆している。

以上の結果と、酵素作用 II はペプチドグリカンには

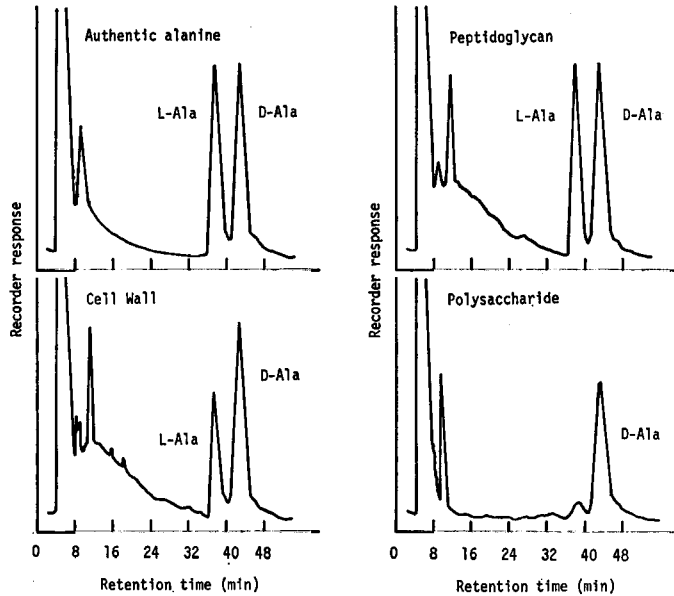


Fig. 10. Analysis of configuration of alanine in cell wall, peptidoglycan and cell wall polysaccharide of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

Table 4. Amino acid and amino sugar analysis of cell wall and peptidoglycan from *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

Component	Cell wall		Peptidoglycan***	
	Amount (μ moles/mg)	Molar ratio to glutamic acid	Amount (μ moles/mg)	Molar ratio to glutamic acid
Glutamic acid*	0.354	1.00	0.516	1.00
Alanine**	0.968	2.75	1.112	2.08
Diaminopimelic acid	0.380	1.07	0.500	0.97
Glucosamine	0.350	0.99	0.476	0.92
Muramic acid	0.200	0.58	0.350	0.68
Ammonia	0.700	1.97	0.824	1.59

* D-glutamic acid.

** L- and D-alanine.

*** This data has reported in *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 21: 65-74 (1975).

Table 5. Phosphorus analysis of cell wall, peptidoglycan and cell wall polysaccharide of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

Sample	Phosphorus (μ g/mg of sample)
Crude cell wall	15.2
Cell wall	12.5
Peptidoglycan	2.8
Polysaccharide	16.5

全く作用しないことより、HM2 フェージ溶菌酵素の酵素作用Ⅱは、細胞壁中のタイコ酸様物質に存在する D-アラニンを遊離させる作用であると考えられた。

考 察

HM2 フェージの溶菌酵素は、その宿主菌の細胞壁ペプチドグリカンのグリカン部を切断する N-acetylmuramidase 作用の他に、ペプチドグリカンからはアミノ基を遊離させず、細胞壁からのみ D-アラニンを遊離させる酵素作用を有していた。細胞壁に対する溶解作用では、この両酵素作用のうち、細胞壁の骨格であるペプチドグリカンを分解する N-acetylmuramidase 作用が主をなすと考えられた。この N-acetylmuramidase 作用は宿主菌の生菌体、ホルマリン処理菌体や熱処理菌体などのいわゆる whole cells には

全く作用しなかつた。これは、本菌を宿主とする HM 3 フェージの溶菌酵素 (N-acetylmuramidase, 田原ら, 1975) や不完全フェージ・クロストシン O の溶菌酵素 (N-acetylmuramidase, Ogata and Hongo, 1979; 緒方ら, 準備中) が宿主菌などを含む *Clostridium* 属細菌の生菌体やホルマリン処理菌体を強く溶菌するのは全く異なっていた。これらの他にも、本菌の HM 7 フェージの溶菌酵素 (N-acetylmuramyl L-alanine amidase) をはじめ多種多様のフェージ溶菌酵素でも whole cells を溶解できることが知られている (緒方, 1977)。HM 2 フェージ溶菌酵素と同じく, whole cells を溶解できない溶菌酵素としては *Staphylococcus aureus* の 80 フェージの溶菌酵素 (peptidase) があるに過ぎない (Doughty and Mann, 1967)。HM 2 フェージ溶菌酵素などのように基質特異性の高いものも基質を細胞壁さらにペプチドグリカンと単純にしていって従つて, 他種由来のものも分解できるようになることが多いので, whole cells を溶解できないのは, 細胞表層に存在するタンパク質や多糖類等による酵素阻害作用や立体障害作用に起因すると考えられる。

N 1-4 菌株の HM 3 フェージなどの多くのフェージでは生菌体やホルマリン処理菌体に多重感染 (moi 100~500) した場合には, フェージ尾部に存在する溶菌酵素の作用によつて, 菌体が直ちに溶菌する lysis from without の現象が認められる。しかし, HM 2 フェージの多重感染ではこの現象が起こらないのは (Hongo and Ogata, 1969), HM 2 フェージの溶菌酵素に細胞の外側から菌体を溶解する作用がないのにも一因があると, 本実験より推考された。

細胞壁から D-アラニンを遊離する酵素作用は, 細胞壁に存在するタイコ酸様物質から D-アラニンを遊離する酵素作用によることが考えられた。C. saccharoperbutylacetonicum のタイコ酸様物質については, その細胞壁のポリサッカライド画分から D-アラニンと比較的多量のリンを検出した結果から, 本物質の存在を示唆できたが, これがタイコ酸そのものか, 或いは他の物質であるかについての確証は現在得られていない。この物質の化学組成や化学構造が明らかにされるに伴つて, D-アラニンを遊離する酵素作用の詳細も明らかになると考えられる。

フェージ由来の溶菌酵素で, ペプチドグリカンを分解する酵素以外のものとしては, 細胞表層の夾膜等を分解する *P. aeruginosa* の 2 フェージの polysaccharide depolymerase (Bartell et al., 1968), *E. coli*

の 29 フェージの capsular polysaccharide depolymerase (Yurewicz et al., 1971), *B. natto* と *B. subtilis* のフェージの γ -polyglutamate depolymerase (Yoshimoto et al., 1973), *S. typhimurium* の e¹⁵ フェージの O-antigen hydrolase (Kanegasaki and Wright, 1973) や *Klebsiella aerogenes* のフェージの mannosidase などが報告されている (緒方, 1977)。これらの酵素はペプチドグリカンには作用しないので, 単独では菌体を溶解することはできない。しかし, ペプチドグリカンに作用する溶菌酵素と共同で, フェージ感染の最終期に作用して菌体表層構造を破壊し, 娘フェージを効率良く放出拡散させる働きがあると推測されている。また, これらの酵素はフェージ尾部に存在しており, フェージ感染の際に宿主菌の表層構造を破壊して, フェージ侵入を容易にする働きもあると言われている。タイコ酸の D-アラニンを遊離させる酵素の報告は全くないが, HM 2 フェージの溶菌酵素作用 II も同様な役割を演じているものと考えられる。

フェージ由来の溶菌酵素には, 特異性の高い多種多様の酵素が存在する可能性が考えられ, 特異な作用を有する細胞表層分解酵素を検索する場合に, フェージ溶菌液はよい酵素源になると考えられる。

要 約

HM 2 フェージが感染した *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (ATCC 13564) の溶菌液から, この宿主菌の細胞壁の他に, *C. kaneboi*, *C. sporogenes* の細胞壁を溶解する溶菌酵素を, 硫酸塩析, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによつて分離精製した。本酵素は, *Clostridium* 属細菌の生菌体やホルマリン処理菌体を溶解せず, 細胞壁とペプチドグリカンのみを溶解するという高い基質特異性を有していた。本酵素には, 至適 pH 4.0 で, ペプチドグリカンから還元基のみを遊離させてこれを分解する酵素作用 I と, 至適 pH 5.0 で, 細胞壁からのみアミノ基を遊離させる酵素作用 II が存在した。酵素作用 I はペプチドグリカンのグリカン部を切断する N-acetylmuramidase の作用であつた。酵素作用 II は, 分解生成物の N-末端アミノ基が D-アラニンであること, ペプチドグリカンに対して全く作用しないことなどから, 細胞壁に存在するタイコ酸様物質の D-アラニンを遊離させる作用であると考えられた。

文 献

- Bartell, P. E., G. K. H. Lam and T. E. Orr 1968 Purification and properties of polysaccharide depolymerase associated with phage-infected *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, **243**: 2077-2080
- Bessler, W., H. Knirfermann and S. Stirm 1975 *Escherichia coli* capsule bacteriophages IV. Free capsule depolymerase 29. *J. Virol.*, **15**: 976-984
- Chen, P. S., T. Y. Toribara and H. Warner 1956 Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, **28**: 1756-1758
- Doughty, C. C. and J. A. Mann 1967 Purification and properties of a bacteriophage-induced cell peptidase from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **93**: 1089-1095
- Ghuysen, J. M., D. T. Tipper and J. L. Strominger 1966 Enzymes that degrade bacterial cell walls. In "Methods in Enzymology, Vol. 8 Complex Carbohydrates," ed. by E. F. Neufeld and N. Ginsburg, Academic Press, New York, pp. 685-699
- Hasegawa, M. and I. Matsubara 1975 Gas-chromatographic determination of the optical purities of amino acids using their N-trifluoroacetyl methyle esters. *Anal. Biochem.*, **63**: 308-320
- Hongo, M. and A. Murata 1965 Bacteriophages of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* Part I. Some characteristics of the twelve phages obtained from the abnormally fermented broths. *Agric. Biol. Chem.*, **29**: 1135-1139
- Hongo, M. and S. Ogata 1969 Bacteriophages of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* Part VIII. Properties of HM 2 phages inactivated by DNase and the tail of HM 2 phage. *Agric. Biol. Chem.*, **33**: 1-9
- Hongo, M., Y. Tahara and S. Ogata 1974 Lytic enzymes active on *Clostridium* species Part I. Purification and properties of phage HM 7-induced lytic enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, **38**: 755-761
- Inoue, M., N. Arnheim and Strenglanz 1973 Bacteriophage T7 lysozyme is an N-acetylmuramyl L-alanine amidase. *J. Biol. Chem.*, **248**: 7247-7252
- Kanegasaki, S. and A. Wright 1973 Studies on the mechanism of phage adsorption: Interaction between phage ϵ^{15} and its cellular receptor. *Virology*, **52**: 160-173
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Fan and R. T. Randall 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275
- 緒方靖哉 1977 バクテリオフェージの溶菌酵素. 船津勝・鶴大典編: 溶菌酵素. 講談社, 129-151頁
- Ogata, S. and M. Hongo 1979 Bacteriophages of the genus *Clostridium*. In "Advances in Applied Microbiology," Vol. 25, ed. by D. Perlman, Academic Press, New York, pp. 241-273
- Ogata, S., O. Mihara, Y. Ikeda and M. Hongo 1972 Inducible phage tail-like particles of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* and its related strains. *Agric. Biol. Chem.*, **36**: 1413-1421
- Ogata, S., N. Nagao, Z. Hidaka and M. Hongo 1969 Bacteriophages of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* Part XVII. The structure of phage HM 2. *Agric. Biol. Chem.*, **33**: 1541-1552
- Ogata, S., Y. Tahara and M. Hongo 1974 Lytic enzymes active on *Clostridium* species Part II. Mode of action of *Clostridium* phage HM 7-induced lytic enzyme on *Clostridium* cell wall peptidoglycan. *Agric. Biol. Chem.*, **38**: 763-768
- Ogata, S., Y. Tahara and M. Hongo 1975 Chemical composition of cell wall peptidoglycan from *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* with phage endolysins and gas-chromatography. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **21**: 65-74
- Perkins, H. R. 1965 The action of hot formamide on bacterial cell walls. *Biochem. J.*, **95**: 876-882
- Somogyi, M. 1952 Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**: 19-23
- Sutherland, I. W. 1971 The exopolysaccharides of *Klebsiella* serotype 2 strains as substrates for phage-induced polysaccharide depolymerase. *J. Gen. Microbiol.*, **70**: 331-338
- 田原康孝・緒方靖哉・本江元吉 1975 クロストリジウム属細菌を溶解する酵素に関する研究 第Ⅲ報. クロストリジウム・HM3 フェージの溶菌酵素. 農化, **49**: 33-38
- Taylor, A. 1971 Endopeptidase activity of phage λ -endolysin. *Nature (new biology)*, **234**: 144-145
- Tsugita, A. 1971 Phage lysozymes and other lytic enzymes. In "The Enzymes," Vol 5, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York and London, pp. 343-411
- Tsugita, A. and M. Inoue 1968 Purification of bacteriophage T4 lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **243**: 391-397
- Yemm, E. W. and E. C. Cocking 1955 The determination of amino acids with ninhy-

- drin. *Analyst.*, 80: 209-214
- Yoshimoto, A., S. Nomura and M. Hongo 1973 γ -polyglutamic acid depolymerase induced by infections of *natto* and *subtilis* phages and its further properties. *Agric. Biol. Chem.*, 37: 83-90
- Yurewicz, E. C., M. A. Ghalambor, D. H. Duckworth and E. C. Heath 1971 Catalytic and molecular properties of a phage-induced capsular polysaccharide depolymerase. *J. Biol. Chem.*, 246: 5607-5616

Summary

A phage endolysin was isolated from phage HM 2-induced lysate of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (ATCC 13564), by precipitation with ammonium sulfate, and DEAE-cellulose column chromatography. This endolysin lysed the cell walls and peptidoglycans of *C. saccharoperbutylacetonicum* and some other clostridia, but hardly their living whole cells, formalin-treated whole cells and heat-treated whole cells. It had two different lytic activities, which were not separated even by use of electrophoresis on isoelectric focusing. One (activity I) was a N-acetylmuramidase, which cleaved β -1, 4 bonds between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine of peptidoglycan, and its optimum pH was 4.0. The other (activity II) digested the cell wall at optimal pH 5.0, but not peptidoglycan. This digestion of cell wall by the latter was accompanied by the release of NH₂-terminal D-alanine, without concomitant release of NH₂-terminal L-alanine and of COOH-terminal amino acids. Therefore, it was considered that the activity II might attack on the bonds of D-alanine in teichoic acid-like substance of cell wall.